

**Einfluß der Struktur der Phosphorsäure-mono-ester
auf die
Hydrolyse durch „saure“ und „alkalische“ tierische Phosphatase
sowie auf die Lage der pH-Spaltungsoptima**

Walter Stadelmann

Einfluss der Struktur der Phosphorsäure-mono-ester
auf die
Hydrolyse durch „saure“ und „alkalische“ tierische Phosphatase
sowie auf die Lage der pH-Spaltungsoptima

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Walter Stadelmann

aus

München

Oktober 1958



Einfluss der Stellung des Beobachters auf die

Werte

Ergebnisse der Beobachtung, wenn der Beobachter sich
in der Mitte der Beobachtung befindet

Einfluss der Stellung des Beobachters

Werte

Ergebnisse der Beobachtung

Werte

Ergebnisse der Beobachtung

Werte

Ergebnisse der Beobachtung

Werte

Ergebnisse

Werte

Ergebnisse der Beobachtung

Werte

Ergebnisse

Ergebnisse

Berichterstatter: Prof. Dr. E. B a m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 17. DEZ. 1958

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter der Anleitung seines Direktors, Herrn Prof. Dr. E. B a m a n n, in der Zeit von 1955 bis 1958 durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. B a m a n n, bin ich zu aufrichtigem Dank für die Förderung und Lenkung meiner Studien sowie für das Wohlwollen, das er mir in wissenschaftlichen und in persönlichen Dingen jederzeit entgegengebracht hat, verpflichtet.

Es sei mir erlaubt, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. G. -M. S c h w a b für die Anregungen und Einblicke zu danken, die er in so lebendiger Weise in seinem akademischen Unterricht zu vermitteln verstand.

Ich möchte nicht versäumen, Herrn Dr. J. R i e h l für die vielen erlebnisreichen Stunden gemeinsamer Arbeit herzlich zu danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>A. Einleitung</u>	1
<u>B. Theoretischer Teil.</u>	
I. Einfluss der Kettenlänge und der Struktur der Alkoholkomponente auf die Geschwindigkeit der Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen bei 0.04 m Substratkonzentration	2
II. Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeiten und Dissoziationskonstanten der Reaktionszwischenprodukte von der Struktur der Phosphorsäure-mono-ester	3
III. Die Bedeutung von Polarisierung, Nebenvalenzen und sterischer Hinderung für den Zerfall und die Bildung des Reaktionszwischenproduktes	4
IV. Auftreten eines zweiten pH-Spaltungsoptimums im alkalischen Bereich. Beziehungen zwischen der Lage der pH-Optima der „sauen“ und „alkalischen“ Phosphatase und der Struktur der Phosphorsäureester	7
<u>C. Spezieller Teil.</u>	
I. Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern.	
1) Der zeitliche Reaktionsablauf bei der Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen im Falle 0.04 m Substratkonzentration	9
2) Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen bei verschiedener Substratkonzentration	12
3) Affinitätskonstanten und Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktionszwischenverbindungen	15
4) Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration	16
II. Dissoziationskonstanten einiger Phosphorsäure-mono-ester	23
<u>D. Methodischer Teil</u>	
I. Substrate	25
Zur Darstellung sekundärer Phosphorsäure-mono-ester	25

II. Enzympräparate	28
III. Der Versuchsansatz	28
<u>E. Literaturverzeichnis</u>	29

A. Einleitung

Die weitreichende Bedeutung der Phosphatasen im biologischen Geschehen ist seit Jahren bekannt. In jüngerer Zeit sind vor allem intensive Anstrengungen zur Erforschung von Aufbau und Wirkungsweise dieser Enzyme unternommen worden, wobei die Arbeiten von E. BAMANN und seiner Schule entscheidende Erkenntnisse gebracht haben (6, 7, 9, 10, 30). Die Frage nach der Spezifität der Phosphatasen nimmt im Rahmen dieser Bemühungen einen breiten Raum ein, denn die Erforschung der Phosphatase scheint einen Weg zu gehen, der — über die immer genauer werdende Kenntnis von der Wirkungsweise führend — schliesslich die Voraussetzungen für eine konstitutionelle Aufklärung liefert.

Vornehmlich Untersuchungen über die relative Substratspezifität, die besonders auf die Frage nach der Enzym-Substrat-Zwischenverbindung einzugehen haben, erscheinen geeignet, diesem Ziel zu dienen.

Die vorliegende Untersuchung liefert einen Beitrag zu der Frage, welchen Einfluss einerseits strukturelle Veränderungen und andererseits bestimmte Substitutionen im Molekül der Phosphorsäure-mono-ester auf die Spaltbarkeit dieser Ester durch Phosphatasen sowie auf die Lage der pH-Spaltungs-optima ausüben. Hieraus werden Gesetzmässigkeiten erkennbar, die die relative Substratspezifität bedingen.

B. Theoretischer Teil

I. Einfluss der Kettenlänge und der Struktur der Alkoholkomponente auf die Geschwindigkeit der Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen bei 0,04 m Substratkonzentration.

Innerhalb der homologen Reihe der aliphatischen Phosphorsäure-mono-ester besteht nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung und Arbeiten von E. BAMANN und J. RIEHL (6) zwischen der Kettenlänge des organischen Restes und dem bei der enzymatischen Hydrolyse durch die „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen erreichten Umsatz ein gesetzmässiger Zusammenhang: Die Spaltungsgeschwindigkeit nimmt vom Methyl- zum Amylester zu, sowohl in der Reihe der primären als auch in derjenigen der sekundären Ester.

Eine weitere Gesetzmässigkeit gibt sich darin zu erkennen, dass die Ester mit sekundärer alkoholischer Komponente stets geringeren Umsatz aufweisen als die strukturisomeren Ester mit primärer alkoholischer Gruppierung.

Die schlechtere enzymatische Spaltbarkeit solcher Ester im Vergleich zu jener der primären Ester ist bereits in früheren Jahren verschiedenen Autoren aufgefallen (2, 6, 18, 19, 28). Die diesbezüglichen Arbeiten beschränken sich jedoch auf die blosser Feststellung der Tatsache der trägeren Spaltbarkeit der sekundären Ester.

Der mit dem n-Butyl-ester strukturisomere Isobutyl-ester — gekennzeichnet durch Verzweigung der Kohlenstoffkette und durch primäre alkoholische Gruppierung — zeigt praktisch die gleiche Spaltungsgeschwindigkeit wie der n-Butyl-ester.

Der Einfluss elektronegativer Substituenten auf die Umsetzungsgeschwindigkeit wird in der Reihe: Isopropyl-phosphat, Glycerin- α -phosphorsäure, Glycerin- β -phosphorsäure, Mono-[β , β' -dichlor-isopropyl]-phosphat erkennbar. Im Fall der „alkalischen“ Phosphatase nimmt die Verseifungsgeschwindigkeit in der angegebenen Reihenfolge zu¹⁾, bei der „sauren“ Phosphatase kommt die Glycerin- α -phosphorsäure an das Ende der Reihe zu stehen.

¹⁾ Ob und wieweit die Anwesenheit gewisser Metallionen bzw. der Enzymzustand (Iyo-, desmo-Enzym) die gefundene Reihenfolge ändern, wäre noch zu untersuchen. Bekanntlich ist die α -, β -Substratspezifität bei der Spaltung der Glycerinphosphorsäuren durch „alkalische“ Phosphatase von dem Enzymzustand und dem zufälligen Mg²⁺-Gehalt der Lösungen stark abhängig (10).

Phosphorsäure-di-ester zeigen gegenüber den vergleichbaren Mono-estern stets geringeren Umsatz, Phosphorsäure-tri-ester sind unspaltbar. Innerhalb der Di-ester treten ähnliche Spezifitätserscheinungen auf, wie bei den Mono-estern (7).

II. Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeiten und Dissoziationskonstanten der Reaktionszwischenprodukte von der Struktur der Phosphorsäure-mono-ester.

Eine klare Einsicht liegt nunmehr auch hinsichtlich der die Umsetzung bestimmenden Zerfallsgeschwindigkeiten und Dissoziationskonstanten der Reaktionszwischenverbindungen vor.

Mit steigender Kettenlänge des organischen Restes der aliphatischen Phosphorsäureester nehmen die Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktionszwischenprodukte vom Methyl- zum Amyl-ester zu, sowohl innerhalb der Reihe der primären als auch derjenigen der sekundären Ester.

Dieser Gesetzmässigkeit geht parallel ein Ansteigen der Affinität der Ester zu den „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen mit zunehmender Zahl der C-Atome des Alkoholrestes vom Methyl- zum n-Butyl-ester. Der n-Amyl-ester weist allerdings eine kleinere Affinitätskonstante auf als der n-Butyl-ester. Diese liegt zwischen derjenigen des n-Propyl- und derjenigen des n-Butyl-esters.

Den primären Estern kommen stets die grösseren Zerfallsgeschwindigkeiten und Affinitätskonstanten im Vergleich zu den sekundären Estern zu.

Beim n-Butyl-ester (prim. Ester) und beim Isobutyl-ester (prim. Ester mit verzweigter Kohlenstoffkette) sind die Reaktionszwischenprodukte durch gleiche Zerfallsgeschwindigkeiten und gleiche Dissoziationskonstanten gekennzeichnet.

Im Falle des Vorhandenseins eines elektronegativen Substituenten (-OH, -Cl) im alkoholischen Rest des n-Propyl- bzw. Isopropyl-phosphats ergibt sich hinsichtlich Zerfallsgeschwindigkeiten und Affinitäten für die beiden Phosphatasen aus Rinderleber folgendes Bild:

Zerfallsgeschwindigkeiten:

„Saure“ Phosphatase: Isopropyl- < n-Propyl-phosphat < Glycerin- β -phosphorsäure = Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat < Glycerin- α -phosphorsäure

„Alkalische“ Phosphatase: Isopropyl- < n-Propyl-phosphat < Glycerin- α -phosphorsäure < Glycerin- β -phosphorsäure < Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat

Affinitäten:

- „Saure“ Phosphatase: Isopropyl- < n-Propyl-phosphat < Glycerin- α -
< Glycerin- β -phosphorsäure < Mono-[β, β' -
dichlor-isopropyl]-phosphat
- „Alkalische“ Phosphatase: Isopropyl- < Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]- <
n-Propyl-phosphat < Glycerin- α - < Glycerin- β -
phosphorsäure

III. Die Bedeutung von Polarisation, Nebenvalenzen und sterischer Hinderung für den Zerfall und die Bildung des Reaktionszwischenproduktes.

Die an einem umfangreicheren Untersuchungsmaterial, nämlich mit einem grösseren Kreis von Substraten und mehreren Enzymen verschiedener Herkunft, gewonnenen Einblicke erlauben es nunmehr, die enzymatische Phosphorsäureesterhydrolyse, vor allem hinsichtlich der Substratspezifität, besser zu verstehen:

Die Stabilität der C-O-P-Bindung und damit die Hydrolysegeschwindigkeit ist primär von der polarisierenden Wirkung, welche die alkoholische Komponente auf die Esterbindung ausübt, abhängig. Diesem Effekt geht eine Aciditätszunahme bzw. -abnahme der Estersäuren parallel.

Beispielsweise ist daher die C-O-P-Bindung bei den sekundären Estern stabiler als bei den primären Estern, so dass jene langsamer verseift werden. Wird in den beiden CH_3 -Gruppen des Isopropyl-phosphates je ein Wasserstoffatom durch die elektronegativen Chloratome bzw. Hydroxylgruppen ersetzt, so werden diese in unterschiedlichem Mass einen Elektronensog auf die Esterbindung ausüben, was zur Folge hat, dass die C-O-P-Bindung gelockert wird. Dies kommt in einem Ansteigen der Zerfallsgeschwindigkeit vom Isopropyl-phosphat über Glycerin- β -phosphorsäure nach Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat zum Ausdruck²⁾.

Was die Affinität der Phosphorsäureester zu den „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen betrifft, so hängt sie nach den Ergebnissen unserer Untersuchungen sowie Befunden anderer Autoren (13, 14, 20) zunächst ebenfalls von der Acidität der Estersäure ab: mit Zunahme der Acidität steigt die Affinität.

2) Bei der Spaltung durch „saure“ Phosphatasen weisen die Zerfallsgeschwindigkeiten der Glycerin- β -phosphorsäure und des Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphats etwa gleiche Werte auf. Noch auffallender und bisher einer Erklärung nicht zugänglich ist der Befund (s. Abschn. II), dass der Glycerin- α -phosphorsäure hier die grösste Zerfallsgeschwindigkeit zukommt.

So ergibt sich eine Parallelität zwischen Acidität der Estersäure und ihrer Affinität zu den beiden Phosphatasen bei folgenden Substraten:

1. Übergang von primärer zu sekundärer Gruppierung:

Isopropyl- < n-Propyl-phosphat

Sek. -Butyl- < n-Butyl- = Isobutyl-phosphat

Sek. -Amyl- < n-Amyl-phosphat

2. Substitution im aromatischen Kern mit elektropositiven bzw. elektro-negativen Gruppen (13, 14):

o-Kresyl- < Phenyl- < p-Nitrophenyl- < p-Bromphenyl-phosphat

3. Substitution im n- und Isopropyl-phosphat:

n-Propyl-phosphat < Glycerin- α -phosphorsäure

Isopropyl-phosphat < Glycerin- β -phosphorsäure < Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat

4. Die Isomeren der Glycerinphosphorsäure:

Glycerin- α - < Glycerin- β -phosphorsäure

Dass die Affinität mit dem acidifizierenden Einfluss der Substituenten wächst, zeigt sich besonders und durchwegs bei der „sauren“ Phosphatase.

Im Milieu der „alkalischen“ Phosphatase kann der Koordinierungseffekt des Substituenten ausschlaggebend für die Affinität werden: Die Affinität der Glycerin- β -phosphorsäure ist merklich grösser als die des Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphats.

Bei der Deutung dieser Erscheinung ist an die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, zu welcher Hydroxylgruppen besonders befähigt sind, oder an zusätzliche Bindungskräfte zwischen dem im Molekül der „alkalischen“ Phosphatase vorhandenen Magnesium und den Hydroxylgruppen der Glycerinphosphorsäure zu denken. Die endgültige Klärung der Frage setzt noch bessere Kenntnisse vom Aufbau der verschiedenen Phosphatasen voraus³⁾.

³⁾ Es ist beachtenswert, dass die gleichen Verhältnisse hinsichtlich der Affinitäten auch bei der metallionenkatalytischen Spaltung von Isopropyl-phosphat, Glycerin- β -phosphorsäure und Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat im schwach alkalischen Milieu vorliegen. „Die Ester mit Hydroxylgruppen haben eine weit grössere Affinität als der dichlorsubstituierte Ester. Die Bildung des Zwischenproduktes wird also vornehmlich durch die OH-Gruppen begünstigt. Chlor ist demnach nicht oder nur in geringem Masse zur Koordination fähig“ (5).

Als weiteres Beispiel dafür, dass Nebenvalenzen von entscheidender Bedeutung für die Affinität sein können, lassen sich die Affinitätsverhältnisse in der homologen Reihe der aliphatischen Phosphorsäureester anführen: Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der freien Estersäuren hat ergeben, dass diese in der homologen Reihe der aliphatischen Phosphorsäureester praktisch übereinstimmen. Das bedeutet, dass die auftretenden Affinitätsunterschiede andere als bisher besprochene Phänomene zur Ursache haben müssen.

Nach Modellversuchen von H. A. STUART (31) bevorzugt die Paraffinkette die gestreckte Form. Bei zunehmender Kettenlänge steigt die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von „Knäuelformen“ auf Grund der freien Drehbarkeit der Alkylreste um die C-C-Bindung. So würde wohl vom Methyl- bis etwa zum Butyl-ester vornehmlich die gestreckte Kette vorliegen; die Van der Waalsschen Kräfte zwischen Enzymoberfläche und aliphatischem Rest der Ester dürften zunächst zunehmen, dann aber durch fortschreitende Ausbildung der „Knäuelformen“ wieder abgeschwächt werden. In solchen Vorstellungen ist eine brauchbare Erklärungsmöglichkeit für den Gang der Affinität zu den Phosphatasen bei den Phosphorsäuremono-estern innerhalb der homologen Reihe zu sehen⁴⁾.

Es ist naheliegend, dass auch sterische Gründe für die auftretenden Affinitätsunterschiede mitverantwortlich sind. Man wird hierfür die Verhältnisse bei den primären und sekundären Estersäuren anzuführen haben; angesichts der relativ geringen Unterschiede in den Dissoziationskonstanten der primären und sekundären Estersäuren erscheint es zweifelhaft, ob die Affinitätsunterschiede im Falle der beiden Estergruppen allein auf Aciditätsunterschiede zurückführbar sind. Die grössere Raumbeanspruchung durch zwei organische Reste in der Nähe der Esterbindung dürfte zur Folge haben, dass die Annäherung des Substratmoleküls an die Wirkgruppen des Enzyms erschwert wird. Dies manifestiert sich im Absinken der Affinität im Vergleich zu den primären Estern. Diese Annahme findet eine experimentelle Stütze in der Tatsache, dass Spaltbarkeit und Affinität beim Iso-butyl-ester ebenso gross sind wie beim n-Butyl-ester. Hier liegt zwar auch Verzweigung vor, aber in grösserer Entfernung von der Esterbindung, so dass sich die sterische Hinderung nicht mehr auswirkt.

⁴⁾ Die Ergebnisse bei der metallionenkatalytischen Spaltung der aliphatischen Phosphorsäure-mono-ester sprechen für die hier dargelegte Auffassung (8). Für die Erklärung der Tatsache, dass im Gegensatz zu der metallionenkatalytischen Spaltung, wo die Affinität mit zunehmender Kettenlänge des Alkoholrestes gleich bleibt (entsprechend den gleichbleibenden Dissoziationskonstanten der freien Estersäuren), bei der enzymatischen Hydrolyse ein Gang (Anwachsen-Abfallen) der Affinitäten besteht, hat R. NICOLAI (29) ähnliche Gedankengänge herangezogen.

Unbeantwortet bleibt vorerst noch die Frage, worauf das Ansteigen der Zerfallsgeschwindigkeiten mit zunehmender Kettenlänge des organischen Restes der aliphatischen Phosphorsäureester — vom Methyl- zum Amyl-ester — in der Reihe der primären wie der sekundären Ester zurückzuführen ist. Aus der Bestimmung der Verseifungsgeschwindigkeit, der Aktivierungsenergie sowie der Reaktionsordnung bei der Spaltung mittels H-Ionen ist eine weitere Klärung dieser Frage zu erhoffen.

IV. Auftreten eines zweiten pH-Spaltungsoptimums im alkalischen Bereich. Beziehungen zwischen der Lage der pH-Optima der „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatase und der Struktur der Phosphorsäureester.

Für „alkalische“ Rinderleberphosphatase werden gegenüber n-Propyl-, Isopropyl- und sek. Butyl-phosphat anstelle des bisher bekannten einen Optimums (2) zwei pH-Wirkungsoptima gefunden⁵⁾. Gegenüber n-Butyl-phosphat konnte nur ein pH-Wirkungsoptimum ermittelt werden, wohl deshalb, weil die Affinität der „alkalischen“ Phosphatase zu diesem Ester so gross ist, dass erstes und zweites Optimum zu einem interferieren.

Im einzelnen bestehen folgende Gesetzmässigkeiten:

- 1) Das Spaltungsoptimum liegt in der Reihe der primären Phosphorsäureester unabhängig von der Kettenlänge des Alkoholrestes (Methyl- bis Amyl-ester) beim gleichen pH-Wert:

„saure“ Phosphatase aus Schweineleber:	pH =	6.0
„saure“ Phosphatase aus Rinderleber:	pH =	6.1
„alkalische“ Phosphatase aus Schweineleber:	pH =	9.2
„alkalische“ Phosphatase aus Rinderleber:	pH =	8.5 und 9.5

- 2) Das Spaltungsoptimum eines Esters mit sekundärer alkoholischer Komponente liegt im Vergleich zum Spaltungsoptimum des entsprechenden Esters mit primärer alkoholischer Komponente stets zum Neutralpunkt hin verschoben. Dies gilt für die Verseifung sowohl durch „saure“ als auch durch „alkalische“ Phosphatasen (aus Schweine- und aus Rinderleber)⁶⁾.

5) Zwei pH-Wirkungsoptima treten nach E. BAMANN und W. -D. MÜTTERLEIN (4) auch bei der metallionenkatalytischen Spaltung von Phosphorsäureestern auf. Die Ursache dafür ist bekannt; vielleicht dürfen Parallelen gezogen werden.

6) Eine Erklärung dieser Erscheinung ist vorerst noch nicht möglich. Im Falle der im alkalischen Milieu vor sich gehenden metallionen-katalytischen Spaltung liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt: „Die Einführung elektronegativer Substituenten, wie OH und Cl, bedingt eine Verlagerung ins neutrale Gebiet;

- 3) Die Optima der Spaltung von n-Butyl- und Isobutyl-phosphat durch „saure“ und „alkalische“ Phosphatasen (aus Schweineleber) werden bei der gleichen Wasserstoffionenkonzentration gefunden.
- 4) Die Spaltungsoptima von Phosphorsäure-mono-estern sind mit steigender Acidität der Estersäuren im Falle der „sauren“ Phosphatase (aus Rinderleber) immer mehr zum sauren Milieu hin, im Falle der „alkalischen“ Phosphatase (aus Rinderleber) in zunehmendem Masse in das Gebiet stärker alkalischer Reaktion verschoben^{6,7)}. Analoge Verhältnisse siehe unter Punkt 2). Die Optima bei der Spaltung von Glycerin- β -phosphorsäure und Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor-isopropyl]-phosphat durch die „saure“ Phosphatase (aus Rinderleber) fügen sich dieser Regel aus bisher ungeklärten Gründen nicht ein.

„Alkalische“ Phosphatase:

„Saure“ Phosphatase:

	pH-Spal- tungs- optimum:		pH-Spal- tungs- optimum:
Mono-isopropyl-phosphat	7.6 bzw. 9.2	Mono-isopropyl-phosphat	6.4
Mono-n-propyl-phosphat	8.5 bzw. 9.5	Mono-n-propyl-phosphat	6.1
Glycerin- α -phosphorsäure	9.6	Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor-	
Glycerin- β -phosphorsäure	9.7	isopropyl]-phosphat	6.0
Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor-		Glycerin- α -phosphorsäure	5.9
isopropyl]-phosphat	9.9	Glycerin- β -phosphorsäure	5.8

⁶⁾ elektronenabstossende Substituenten, wie die Isopropylgruppe, haben dagegen eine Verschiebung des ersten Optimums ins stärker alkalische Milieu zur Folge.“ Hier ist eine Begründung ohne weiteres möglich: „Der induktive Effekt von OH und Cl, der bekanntlich aciditätssteigernd wirkt, bietet eine einfache Erklärung. Bei solchen Substraten ist bereits im Bereich niedrigerer pH-Werte eine ausreichende Konzentration an Dianionen $RO-PO_3^{2-}$ vorhanden, die mit dem $La(OH)^{2+}$ das zerfallsfähige Zwischenprodukt bilden. Bei diesen Estern liegt das erste Optimum daher näher am Neutralpunkt.“ (5)

⁷⁾ An Hand anderer Enzyme und Substrate haben G. E. DELORY und E. J. KING (13), sowie G. E. DELORY, G. S. WIBERG und M. HETHERINGTON (14) dieselbe Gesetzlichkeit aufgefunden.

C. Spezieller Teil

I. Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern

1) Der zeitliche Reaktionsablauf bei der Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen im Falle 0.04 m Substratkonzentration.

Die Wirkung der „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen aus Schweine- und Rinderleber ist aus den in den Tabellen 1 mit 6 zusammengestellten Ergebnissen ersichtlich.

Tabelle 1

Vergleich des Umsatzes verschiedener Phosphorsäure-mono-ester durch „saure“ Schweineleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enth. in 20 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 2.2 Ph. E. -[e]_{5.5}; 8 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 5.5; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die Spaltung des Esters in Prozenten an.

Ester	Spaltung (%) nach (Std.)			
	1	3	6	24
Mono-n-propyl-phosphat	6.0	15.0	26.3	67.1
Mono-isopropyl-phosphat	3.8	9.4	16.8	39.2
Mono-n-butyl-phosphat	7.1	21.2	37.1	77.0
Mono-sek. -butyl-phosphat	3.1	10.2	18.0	41.2
Mono-isobutyl-phosphat	7.0	21.4	36.8	77.5
Mono-n-amyl-phosphat	11.3	32.8	49.3	70.5
Mono-sek. -amyl-phosphat	5.3	14.4	25.6	57.5

Tabelle 2

Vergleich des Umsatzes verschiedener Phosphorsäure-mono-ester durch
„alkalische“ Schweineleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enth. in 20 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 0.25 Ph. E. $-[e]_9^-$;
8 ccm 2.5 n Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer pH = 9.0; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die Spaltung des Esters in Prozenten an.

Ester	Spaltung (%)		nach (Std.)	
	1	3	6	24
Mono-n-propyl-phosphat	0.4	1.0	1.5	2.1
Mono-isopropyl-phosphat	0.2	0.3	0.6	1.0
Mono-n-butyl-phosphat	0.8	1.5	2.3	5.3
Mono-sek. -butyl-phosphat	0.2	0.4	0.7	1.0
Mono-isobutyl-phosphat	0.8	1.5	2.2	5.4
Mono-amyl-phosphat	0.7	1.7	2.9	5.7
Mono-sek. -amyl-phosphat	0.1	0.2	0.3	0.6

Tabelle 3

Vergleich des Umsatzes verschiedener Phosphorsäure-mono-ester durch
„saure“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enth. in 20 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 0.57 Ph. E. $-[e]_{5.5}^-$;
8 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 5.5; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die Spaltung des Esters in Prozenten an.

Ester	Spaltung (%)		nach (Std.)	
	1	3	6	24
Mono-n-propyl-phosphat	1.9	4.7	8.6	24.5
Mono-isopropyl-phosphat	0.6	1.8	3.4	10.5
Mono-n-butyl-phosphat	3.0	7.2	11.2	30.0
Mono-sek. -butyl-phosphat	0.8	2.3	3.8	11.9

Tabelle 4

Vergleich des Umsatzes verschiedener Phosphorsäure-mono-ester durch
„alkalische“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enth. in 20 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 2.0 Ph. E. $-[e]_9^-$;
 8 ccm 2.5 n Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer pH = 9.0; 2 Tr. Toluol)

Die Zahlen geben die Spaltung des Esters in Prozenten an.

Ester	Spaltung (%)		nach (Std.)	
	1	3	6	24
Mono-n-propyl-phosphat	2.1	4.7	8.3	20.5
Mono-isopropyl-phosphat	0.5	0.8	1.4	4.1
Mono-n-butyl-phosphat	2.9	6.8	10.9	29.2
Mono-sek. - butyl-phosphat	0.8	1.4	2.2	3.5

Tabelle 5

Vergleich des Umsatzes verschiedener Phosphorsäure-mono-ester durch
„saure“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enth. in 20 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 1.0 Ph. E. $-[e]_{5.5}$;
 8 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 5.8; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die Spaltung des Esters in Prozenten an.

Ester	Spaltung (%)			nach (Std.)	
	1	3	6	12	24
Glycerin- β -phosphorsäure	2.5	5.7	10.5	18.0	27.1
Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor-isopropyl]-phosphat	2.6	6.1	12.1	19.6	28.8

Tabelle 6

Vergleich des Umsatzes verschiedener Phosphorsäure-mono-ester durch
„alkalische“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enth. in 20 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 1.9 Ph. E. $-[e]_9^-$;
 8 ccm 2.5 n Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer pH = 9.5; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die Spaltung des Esters in Prozenten an.

Ester	Spaltung (%)			nach (Std.)	
	1	3	6	12	24
Glycerin- β -phosphorsäure	4.8	9.6	12.0	12.3	12.4
Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor-isopropyl]-phosphat	4.9	13.0	17.1	21.3	24.0

2) Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen bei verschiedener Substratkonzentration.

Der Umsatz bei verschiedener Substratkonzentration im Falle der Spaltung einer Reihe von Phosphorsäure-mono-estern durch die „saure“ Phosphatase der Schweineleber sowie durch die „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen der Rinderleber ist aus den Ergebnissen der Tabellen 7 mit 13 zu ersehen.

Tabelle 7

Einfluss der Substratkonzentration auf die Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch „saure“ Schweineleberphosphatase

(Die Vers. Ans. enthalten in 10 ml: Ester in angeg. Molarität; 0.6 Ph. E. $-[e]_{5.5}$; 4 ml 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 6.0; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die in 1 ml in 6 Std. abgespaltenen γ P an.

Ester	Molarität des Esters							
	0.4	0.2	0.1	0.04	0.02	0.01	0.001	0.0001
Mono-n-propyl-	967	630	380	250	168	100	28	6
Mono-iso-propylphosphat	870	550	320	200	118	69	18	5

Tabelle 8

Einfluss der Substratkonzentration auf die Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch „saure“ Schweineleberphosphatase

(Die Vers. Ans. enthalten in 10 ml: Ester in angeg. Molarität; 1.1 Ph. E. $-[e]_{5.5}$; 4 ml 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 6.10; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die in 1 ml in 2 Std. abgespaltenen γ P an.

Ester	Molarität des Esters					
	0.2	0.1	0.04	0.02	0.01	0.001
Mono-n-butyl-	270	221	172	133	100	30
Mono-sec. -butylphosphat	154	130	102	75	51	15

Tabell

Affinitätskonstanten verschiedener Ester i

Enzym	Mono-n-propyl-phosphat		Mono-isopropyl-phosphat		Mono-n-butyl-phosphat		Mono-isobutyl-phosphat		Mono-sek.-butyl-phosphat	
	K·10 ⁴	1/K	K·10 ⁴	1/K	K·10 ⁴	1/K	K·10 ⁴	1/K	K·10 ⁴	1/K
„Saure“ Schweineleber-phosphatase	480	21	710	14	150	65	149	67	230	43
„Saure“ Rinderleber-phosphatase	170	58	370	27	128	78	--	--	182	55
„Alkalische“ Rinderleber-phosphatase	87	115	660	15	80	125	--	--	250	40

Tabell

Relative Zahlen der Zerfallsgeschwindigke
von verschiedenen Phosp

(Zerfallsgeschwindigkeit von M

Enzym	Mono-n-propyl-phosphat	Mono-isopropyl-phosphat	Mono-n-butyl-phosphat	Mono-isobutyl-phosphat	Mono-sek.-butyl-phosphat
„Saure“ Schweineleber-phosphatase	1. 0	0. 97	1. 25	1. 25	0. 83
„Saure“ Rinderleber-phosphatase	1. 0	0. 64	1. 41	---	0. 57
„Alkalische“ Rinderleber-phosphatase	1. 0	0. 41	1. 80	--	0. 43

n Falle einiger tierischer Phosphatasen

Mono-n-amyl-phosphat		Mono-sek.-amyl-phosphat		Glycerin- α -phosphorsäure		Glycerin- β -phosphorsäure		Mono- [β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat	
K $\cdot 10^4$	1/K	K $\cdot 10^4$	1/K	K $\cdot 10^4$	1/K	K $\cdot 10^4$	1/K	K $\cdot 10^4$	1/K
190	53	360	28	--	--	--	--	--	--
--	--	--	--	166	60	83	120	54	185
--	--	--	--	83	120	40	250	133	75

iten der Reaktionszwischenverbindungen

phosphorsäure-mono-estern

(mono-n-propyl-phosphat = 1)

Mono-n-amyl-phosphat	Mono-sek.-amyl-phosphat	Glycerin- α -phosphorsäure	Glycerin- β -phosphorsäure	Mono- [β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat
2. 40	1. 65	--	--	--
--	--	1. 40	1. 16	1. 04
--	--	2. 06	2. 67	5. 30

Tabelle 9

Einfluss der Substratkonzentration auf die Spaltung von
Phosphorsäure-mono-estern durch „saure“ Schweineleberphosphatase

(Die Vers. Ans. enthalten in 10 ml: Ester in angegebener Molarität;
1. 1 Ph. E. $-[e]_{5.5}$; 4 ml 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 6.10; 2 Tr. Tolucl.)

Die Zahlen geben die in 1 ml in 1 Std. abgespaltenen γ P an.

Ester	Molarität des Esters					
	0.2	0.1	0.04	0.02	0.01	0.001
Mono-n-amy1-	311	243	177	134	91	28
Mono-sec. -amy1phosphat	188	132	91	61	41	13

Tabelle 10

Einfluss der Substratkonzentration auf die Spaltung von
Phosphorsäure-mono-estern durch „saure“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. Ans. enthalten in 10 ml: Ester in angegebener Molarität;
0.28 Ph. E. $-[e]_{5.5}$; 4 ml 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 6.10; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die in 1 ml in 2 Std. abgespaltenen γ P an.

Ester	Molarität des Esters							
	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02	0.01	0.001
Mono-n-propyl-	115	78	58	-	40	30	21	7
Mono-iso-propyl-	48	37	30	-	21	14	9	2
Mono-n-butyl-	64	73	74	-	63	51	36	7
Mono-sec. -butylphosphat	-	33	29	24	-	17	12	3

Tabelle 11

Einfluss der Substratkonzentration auf die Spaltung von
Phosphorsäure-mono-estern durch „alkalische“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. Ans. enthalten in 10 ml: Ester in angegebener Molarität;
1.0 Ph. E. $-[e]_9^-$; 4 ml 2.5 n Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer pH = 9.2; 2 Tr. Toluol. Die Zahlen geben die in 1 ml in 2 Std. abgespaltenen γ P an.

Ester	Molarität des Estern							
	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02	0.01	0.001
Mono-n-propyl-	-	45	42	-	38	32	25	9
Mono-iso-propyl-	13	12	11	-	7	5	3	1
Mono-n-butyl-	-	69	74	-	69	59	46	15
Mono-sec. -butylphosphat	-	22	17	13	-	9	6	2

Tabelle 12

Einfluss der Substratkonzentration auf die Spaltung von
Phosphorsäure-mono-estern durch „saure“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enthalten in 10 ccm: Ester in angeg. Molarität; 0.5 Ph. E. $-[e]_{5.5}$
4 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch pH = 6.0; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die in 1 ccm in 2 Std. abgespaltenen γ P an.

Ester	Molarität des Esters							
	0.1	0.02	0.01	0.005	0.003	0.0025	0.002	0.001
Glycerin- α -		47		16	12	10	8	
Glycerin- β -phosphor- säure	73	46	36	24	18	15	13	7
Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor- isopropyl]-phosphat	67	49	38	28	22	19	16	10

Tabelle 13

Einfluss der Substratkonzentration auf die Spaltung von
Phosphorsäure-mono-estern durch „alkalische“ Rinderleberphosphatase

(Die Vers. -Ans. enthalten in 10 ccm: Ester in angeg. Molarität; 0.95 Ph. E. $-[e]_9^-$;
4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer pH = 9.8; 2 Tr. Toluol.)

Die Zahlen geben die in 1 ccm in 2 Std. abgespaltenen γ P an.

Ester	Molarität des Esters							
	0.1	0.02	0.01	0.005	0.003	0.0025	0.002	0.001
Glycerin- α -		110		60	45	38	29	
Glycerin- β -phosphor- säure	93	103	80	64	56	47	41	24
Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor- isopropyl]-phosphat	106	119	99	73	52	37	30	17

3) Affinitätskonstanten und Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktions-
zwischenverbindungen.

Aus den in den Tabellen 7 mit 13 zusammengestellten Werten lassen sich die Affinitätskonstanten und Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktionszwischenverbindungen ermitteln.

Die Berechnung wurde gemäss der Gleichung

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{S},$$

worin v die Reaktionsgeschwindigkeit, V die Maximalgeschwindigkeit, K_m die MICHAELIS-Konstante und S die Substratkonzentration bedeuten, nach der Methode von H. LINEWEAVER und D. BURK (23) durchgeführt: $1/S$ gegen $1/v$ in einem Diagramm aufgetragen, ergibt eine Gerade, die auf der Abszisse den Wert $-1/K_m$ und auf der Ordinate den Wert $1/V$ abschneidet.

Die auf diese Weise erhaltenen Werte, nämlich $K_m \cdot 10^4$, $1/K_m$, sowie die relativen Zahlen der Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktionszwischenverbindungen, sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengestellt.

4) Spaltung von Phosphorsäure-mono-estern durch tierische Phosphatasen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

Der Umsatz bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration im Falle der Spaltung einer Reihe von Phosphorsäure-mono-estern durch die „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen der Schweine- und Rinderleber ist aus den Abbildungen 1 mit 7 zu ersehen.

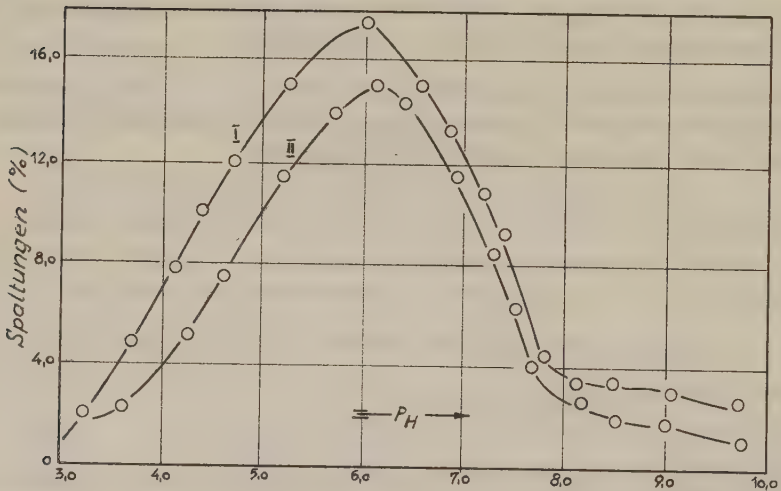


Abbildung 1

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Mono-n-propyl-(I) und Mono-isopropyl-(II)phosphat mit Schweineleberautolysat.

(Die Vers. -Ans. enth. in 10 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 1. 1 Ph. E. $-[e]_{5.5}$ bzw. 0.13 Ph. E. $-[e]_9$; 4 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch der angegebenen pH-Stufe bzw. 4 ccm 2.5 n Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe.)

(Reaktionsdauer = 6 Std. ; Reaktionstemperatur = 37° C)

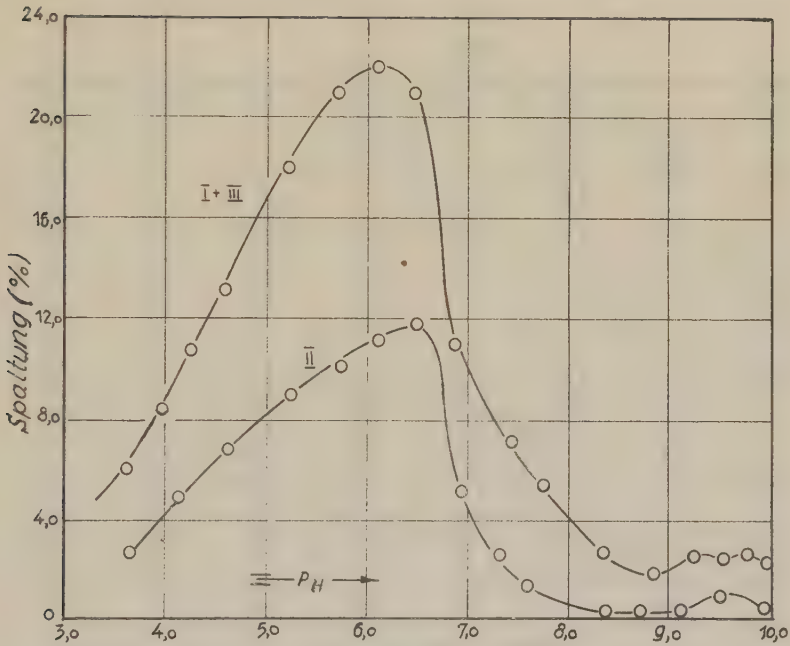


Abbildung 2

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Mono-n-butyl-(I)
Mono-sek. -butyl-(II) und Mono-isobutyl-(III)phosphat mit Schweineleberautolysat.

(Die Vers. -Ans. enth. in 10 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 1.1 Ph. E. $-[e]_{5.5}$ bzw. 0.13 Ph. E. $-[e]_9$; 4 ccm 1 m Citrat- Puffergemisch der angegebenen pH-Stufe bzw. 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe.)

(Reaktionsdauer = 3 Std; Reaktionstemperatur = 37°C)

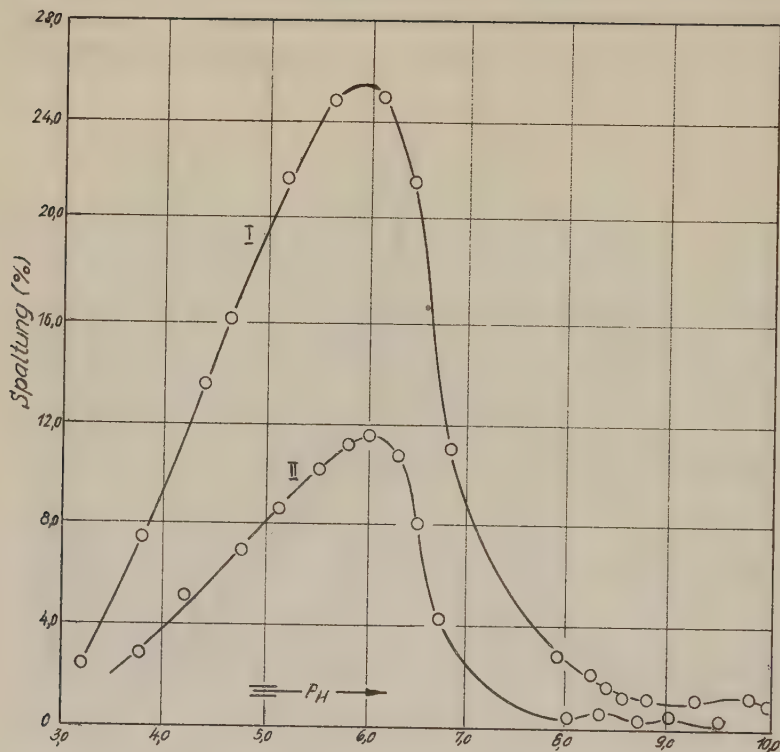


Abbildung 3

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Mono-n-amyI-(I) und Mono-sek.-amyI-(II)phosphat mit Schweineleberautolysat.

(Die Vers.-Ans. enth. in 10 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 1.1 Ph. E. $-[e]_{5.5}$ bzw. 0.13 Ph. E. $-[e]_9$; 4 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch der angegebenen pH-Stufe bzw. 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe.)

(Reaktionsdauer = 2 Std; Reaktionstemperatur = 37°C)

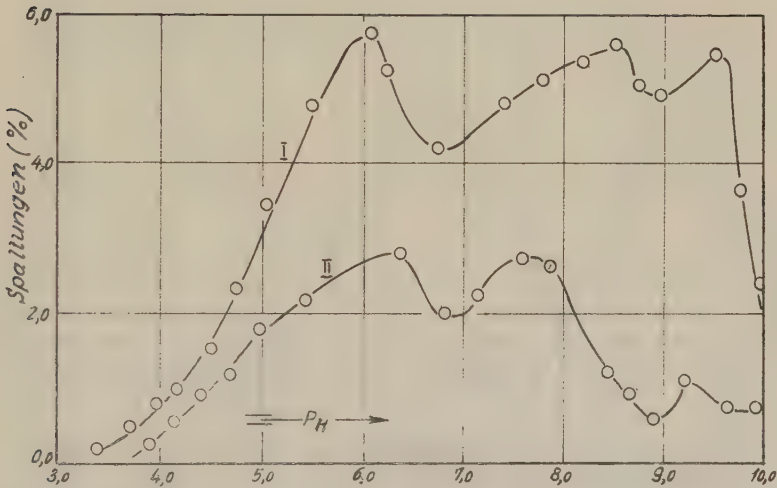


Abbildung 4

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Mono-n-propyl-(I)
und Mono-isopropyl-(II)phosphat mit Rinderleberautolysat.

(Die Vers. -Ans. enth. in 10 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 0.25 Ph. E. $-[e]_{5.5}$
bzw. 1.0 Ph. E. $-[e]_9$; 4 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch der angegebenen
pH-Stufe bzw. 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen
pH-Stufe.)

(Reaktionsdauer = 3 Std. ; Reaktionstemperatur = 37°C)

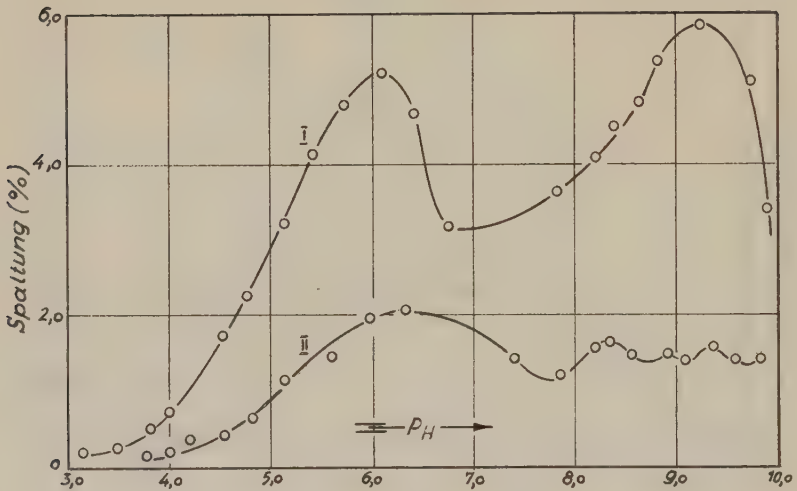


Abbildung 5

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Mono-n-butyl-(I)
und Mono-sec.-butyl-(II)phosphat mit Rinderleberautolysat.

(Die Vers.-Ans. enth. in 10 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 0.25 Ph. E. $-[e]_{5.5}$ bzw. 1.0 Ph. E. $-[e]_9$; 4 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch der angegebenen pH-Stufe bzw. 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe.)

(Reaktionsdauer = 2 Std; Reaktionstemperatur = 37°C)

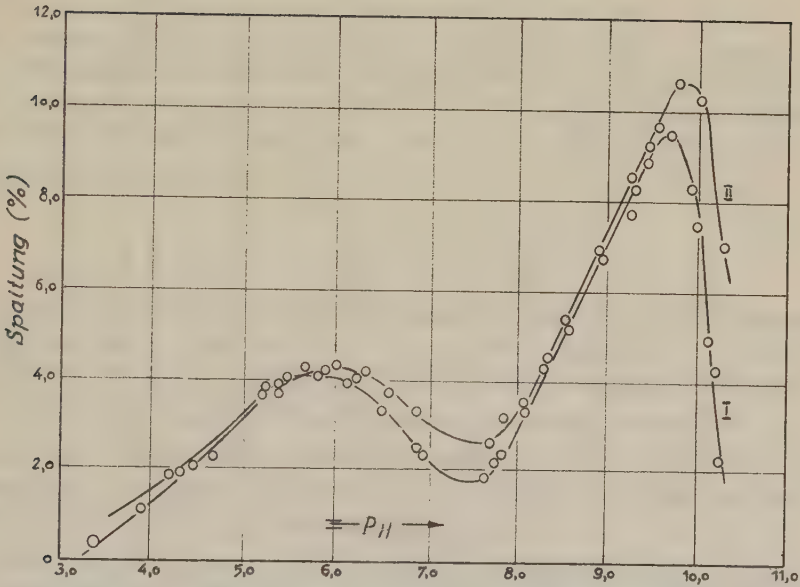


Abbildung 6

Aktivitäts-pH-Kurven im Falle der Spaltung von Glycerin- β -phosphorsäure(I) und Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor-isopropyl]-(II)phosphat mit Rinderleberautolysat.

(Die Vers. -Ans. enth. in 10 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 0.5 Ph. E. $-\text{[e]}_{5.5}$ bzw. 0.95 Ph. E. $-\text{[e]}_9$; 4 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch der angegebenen pH-Stufe bzw. 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe.)

(Reaktionsdauer = 2 Std; Reaktionstemperatur = 37°C)

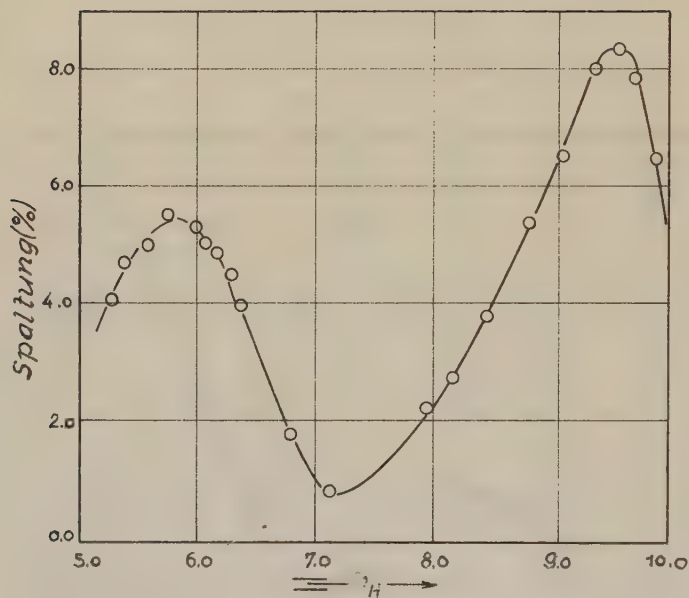


Abbildung 7

Aktivitäts-pH-Kurve im Falle der Spaltung von Glycerin- α -phosphorsäure mit Rinderleberautolysat.

(Die Vers. -Ans. enth. in 10 ccm: Ester in 0.04 m Lösung; 0.50 Ph. E. $-[e]_{5.5}$ bzw. 0.75 Ph. E. $-[e]_9$; 4 ccm 1 m Citrat-Puffergemisch der angegebenen pH-Stufe bzw. 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer der angegebenen pH-Stufe.)

Reaktionsdauer = 2 Std; Reaktionstemperatur = 37°C)

II. Dissoziationskonstanten einiger Phosphorsäuremono-ester

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der freien Estersäuren wurde nach F. KOHLRAUSCH (21) unter Zugrundelegung des OSTWALDschen Verdünnungsgesetzes in folgender Form

$$\frac{c \cdot \lambda^2}{\lambda_{\infty} - \lambda_c} \cdot \frac{1}{\lambda_{\infty}} = K_c \quad (1)$$

durchgeführt. Dabei bedeuten c = Konzentration des Elektrolyten in Gramm-Äquivalenten pro Liter, λ_c die gemessene Äquivalentleitfähigkeit, λ_{∞} die Äquivalentleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung und K_c die Dissoziationskonstante. Die Äquivalentleitfähigkeit ist definiert als $= 1000 x/c$, wobei x die gemessene spezifische Leitfähigkeit darstellt und c wieder das Äquivalentgewicht in Gramm.

Schreibt man (1) um zu

$$c \cdot \lambda_c + K_c \cdot \lambda_{\infty} = \frac{K_c \cdot \lambda_{\infty}^2}{\lambda_c} \quad (2)$$

so lassen sich λ_{∞} und K_c graphisch bestimmen durch Messung der Konzentrationsabhängigkeit von λ_c . Man stellt dazu $1/\lambda_c = y$ als Funktion von $c \cdot \lambda_c = x$ dar und erhält so eine Gerade, welche die Ordinate beim Wert $1/\lambda_{\infty}$ schneidet und eine Steigung $1/K_c \cdot \lambda_{\infty}^2$ hat.

Da nur die relativen Unterschiede in der Acidität der einzelnen Estersäuren von Interesse waren, wurden bei der Berechnung der Äquivalentleitfähigkeiten die Estersäuren als einbasische Säuren behandelt.

Die Messung der spezifischen Leitfähigkeiten erfolgte mit einem direkt anzeigenden Gerät der Firma L. Püsl, München, dessen Einstabelektrode eine konstante Widerstandskapazität von 1.07 aufwies.

Die Messlösungen wurden in einem Ultrathermostaten auf die konstante Temperatur von 25°C gebracht. Die freien Estersäuren konnten quantitativ aus den Estersalzen durch Austausch an dem sauren Kationenaustauscher „Amberlite IR 120“ gewonnen werden.

Die nach vorstehend beschriebener Methode ermittelten Dissoziationskonstanten sind in der umstehenden Übersicht zusammengestellt:

Ester	Dissoziationskonstante ($K_c/25^\circ C$)
Mono-n-propyl-phosphat	$2.21 \cdot 10^{-2}$
Mono-isopropyl-phosphat	$1.68 \cdot 10^{-2}$
Mono-n-butyl-phosphat	$2.41 \cdot 10^{-2}$
Mono-n-amyl-phosphat	$2.63 \cdot 10^{-2}$
Mono-sek. -n-amyl-phosphat	$1.51 \cdot 10^{-2}$
Mono-n-octyl-phosphat	$2.72 \cdot 10^{-2}$
Glycerin- β -phosphorsäure	$3.10 \cdot 10^{-2}$
Mono-[β, β' -dichlor-isopropyl]-phosphat	$1.29 \cdot 10^{-1}$

D. Methodischer Teil

I. Substrate

- 1) Glycerin- α -phosphorsäure als $\text{CaC}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (246. 2),
E. Merck, Darmstadt, List. Nr. 4111. --
- 2) Glycerin- β -phosphorsäure als $\text{Na}_2\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (306. 2),
Farbenfabriken Bayer, Leverkusen. --
- 3) Mono-n-propyl-phosphat als $\text{Ba C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (311. 5),
dargestellt nach K. ASAKAWA (1), nach Überführung in das Kaliumsalz. --
- 4) Mono-isopropyl-phosphat als $\text{BaC}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (311. 5),
dargestellt nach K. ASAKAWA (1), nach Überführung in das Kaliumsalz. --
- 5) Mono-n-butyl-phosphat als $(\text{NH}_4)\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (189. 2),
dargestellt nach R. HOTTA (17). --
- 6) Mono-isobutyl-phosphat als $(\text{NH}_4)\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (189. 2),
dargestellt in Übertragung des Verfahrens zur Darstellung von Mono-n-butyl-phosphat nach R. HOTTA (17). --
- 7) Mono-n-amyl-phosphat als $\text{Ba C}_5\text{H}_{11}\text{O}_4\text{P}$ (303. 4),
dargestellt nach F. FALKENHAUSEN, Freiherr v. (15), nach Überführung in das Natriumsalz. --
- 8) Mono- $[\beta, \beta'$ -dichlor-isopropyl]-phosphat als $\text{BaC}_3\text{H}_5\text{Cl}_2\text{O}_4\text{P}$ (344. 3), darge-
stellt nach C. MANAKA (26), nach Überführung in das Natriumsalz.

Die verwendeten Substrate waren praktisch frei von anorganischem Phosphat.

Zur Darstellung sekundärer Phosphorsäure-mono-ester

Für die Gewinnung aliphatischer Monoester der Phosphorsäure eignen sich die gebräuchlichen Verfahren in ungleichem Masse. Monoester mit primären Alkoholen sind über die Methoden der Einwirkung von Polyphosphorsäuren (Gemische von P_2O_5 und H_3PO_4) auf Alkohol (1, 11, 12, 17) oder der Umsetzung von Phosphoroxychlorid mit Natriumalkoholat und anschliessen-der Hydrolyse des Estersäurechlorids (15) leicht und in guten Ausbeuten zugänglich. Demgegenüber können die Ester mit sekundären Alkoholen nach diesen Verfahren entweder gar nicht (Mono-sek. -n-amyl-phosphat) oder nur in ganz geringen Ausbeuten gewonnen werden (22). Versuche, Ester mit tertiären Alkoholen auf einem dieser Wege darzustellen, führen nach unseren Erfahrungen überhaupt nicht zum Ziel.

Unschwer und in befriedigenden Ausbeuten lassen sich aber die Ester mit sekundären Alkoholen aus den entsprechenden Halogenalkylen und Silberphosphat darstellen.

Mittels dieses Verfahrens konnten F. ZETZSCHE und M. NACHMANN einige schwerer zugängliche Phosphorsäureester gewinnen (33). Unter den Versuchsbedingungen dieser Autoren erreicht man indes im Falle der Ester mit sekundären Alkoholen nur Ausbeuten zwischen 10 und 15 Prozent, ein Erträgnis, das auch ZETZSCHE und NACHMANN bei der Darstellung ihrer Ester gefunden haben. Diese niedrigen Ausbeuten sind zweifelsohne von Konkurrenzreaktionen verursacht, die neben der Esterbildung ablaufen.

Bei dem Verfahren - soll es ertragreich verlaufen - empfehlen sich folgende Versuchsbedingungen:

1. Anwendung hochkonzentrierter Phosphorsäurelösungen - es wurde Ag_3PO_4 gelöst in 90-95proz. Phosphorsäure verwendet anstelle von 80-50proz. Phosphorsäurelösungen -; dadurch wird eine Säurespaltung des gebildeten Esters weitgehend vermieden.
2. Abgehen von stöchiometrischen Mengenverhältnissen und Anwendung des AgH_2PO_4 in etwa 10proz. Überschuss; es verschiebt sich dadurch die Gleichgewichtslage zugunsten des Esters.
3. Reaktionsablauf unter starker Kühlung statt bei Zimmertemperatur; Nebenreaktionen mit grossem Temperaturkoeffizienten werden dadurch hintangehalten.

Mono-sek. -n-amyI-phosphat und Mono-sek. -butyl-phosphat können auf diesem Wege mit Ausbeuten von 40% dargestellt werden. Auch die in der Reihe der aliphatischen Phosphorsäure-mono-ester am schwersten zugänglichen Ester mit tertiären Alkoholen lassen sich mit diesem Verfahren erhalten, allerdings in recht geringen Ausbeuten. Dies ist erwähnenswert, weil auch das elegante Verfahren der Umsetzung von Halogenalkyl mit dem Silbersalz des Dibenzylphosphats (25) und des anschliessenden Abhydrierens der Benzylreste als Toluol, das bei schwer zugänglichen Phosphorsäureestern in manchen Fällen gute Ergebnisse zeitigt (32), bei Estern mit tertiärem Alkohol nach unseren Erfahrungen nicht zum Erfolg führt.

Bei der Reaktion von Tert. -Butylchlorid mit dem Silbersalz des Dibenzylphosphats in verschiedenen Lösungsmitteln (Alkohol, Äther, Dioxan) wird gar kein Tri-ester, sondern freies Dibenzylphosphat gebildet.

Dieser Befund und unsere Beobachtungen bei der Darstellung sekundärer Phosphorsäure-mono-ester zeigen, dass die Veresterung von Alkoholen mit sekundären bzw. tertiären alkoholischen Gruppen in stärkerem Masse von Nebenreaktionen behindert

wird, als dies bei primären Alkoholen der Fall ist. Dabei ist, insbesondere bei tertiären Alkoholen, deren Neigung, bei Veresterungsreaktionen in ungesättigte Körper vom Olefintypus überzugehen, zu berücksichtigen (27).

Darstellung von Mono-sek. -butyl-phosphat.

7.7 g Ag_3PO_4 (entspr. 10% über $1/20$ Mol AgH_2PO_4) werden unter leichtem Erwärmen in 15 ccm 90-95proz. Phosphorsäure gelöst. Zu der zähen Lösung in einem mit Eis-Kochsalz-Mischung gekühlten Dreihalskolben lässt man unter kräftigem Rühren aus einem Tropftrichter eine Lösung von 6.85 g ($1/20$ Mol) sek. -Butylbromid in etwa 15 ccm Alkohol langsam zulaufen. Anschliessend bleibt das Reaktionsgemisch noch etwa 1 Std. stehen und wird dann nach Ausäthern (Zur Entfernung des nicht umgesetzten Halogenalkyls) in 1000 ccm einer mit Bariumhydroxydlösung alkalisch gemachten Bariumbromidlösung eingegossen. Dabei fallen überschüssige Phosphorsäure als $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, überschüssiges Silberion als AgBr bzw. Ag_3PO_4 aus, während das Bariumsalz des gebildeten Esters in Lösung bleibt. Das gegen Phenolphthalein alkalische Filtrat wird mit Bariumbromid auf Silberfreiheit geprüft, durch Einleiten von Kohlendioxyd von überschüssigem Bariumhydroxyd befreit und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Rückstand nimmt man mit absolutem Alkohol auf und fällt daraus das Estersalz mit Äther. Das feinkristalline Estersalz wird abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Ausbeute: 5.8 g = 40% der Theorie, berechnet auf Halogenalkyl

Analyse: Für $\text{C}_4\text{H}_9\text{OPO}_3\text{Ba}$ (289.47) berechnet: P 10.74%
gefunden: P 10.67%

Das Estersalz war praktisch frei von anorganischem Phosphat.

Darstellung von Mono-sek. -n-amyl-phosphat.

Ausgangsmengen: 7.7 g Ag_3PO_4 (entspr. 10% über $1/20$ Mol AgH_2PO_4), 15 ccm 90-95proz. H_3PO_4 , 7.55 g ($1/20$ Mol) 2-Brompentan.

Für die Darstellung von Mono-sek. -n-amyl-phosphat ändert sich die vorstehende Darstellungsvorschrift dahingehend, dass anstelle von Bariumhydroxyd mit Natronlauge und Natriumcarbonat neutralisiert wird, da das Bariumsalz dieses Esters bereits schlecht in Wasser löslich ist. Hierbei fällt das überschüssige Silber als Ag_3PO_4 ; das Filtrat wird wieder im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Methanol aufgenommen und der Ester mit Bariumbromidlösung als Ba-Salz gefällt.

<u>Ausbeute:</u>	6.1 g = 41% der Theorie,	berechnet auf Halogenalkyl
<u>Analyse:</u>	Für $C_5H_{11}OPO_3Ba$ (303.48)	berechnet: P 10.21%
		gefunden: P 10.12%

II. Enzympräparate

Als Enzymlösungen, enthaltend „saure“ und „alkalische“ Phosphatase, dienten dialysierte Autolysate aus Schweineleber und Rinderleber: 1 Tl. Leberhackbrei + 3 Tle. dest. Wassers + Toluol 72 Stdn. bei Zimmertemperatur; Zentrifugat 72 Stdn. in Kunststoffschläuchen gegen dest. Wasser dialysiert. Abtrennung der wirkungslosen Ausflockung.

III. Der Versuchsansatz

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist jeweils bei den einzelnen Tabellen angegeben. Die Reaktionsgemische wurden in Schüttelkolben unter leichtem Schütteln im Thermostaten bei 37°C gehalten.

Die zu den verschiedenen Reaktionszeiten entnommenen Analysenproben betrugen 2-1 ccm. Die Messung der abgespaltenen Phosphorsäure erfolgte nach vorausgegangener Enteiweissung mittels Trichloressigsäure nach der Methode von C. H. FISKE und Y. SUBBAROW (16), modifiziert von K. LOHMANN und L. JEN-DRASSIK (24), mit Hilfe eines lichtelektrischen Colorimeters, Modell V, nach B. LANGE (3).

E. Literaturverzeichnis

- (1) Asakawa, K. : J. Biochemistry 10, 157 (1928)
- (2) Asakawa, K. : J. Biochemistry 11, 143 (1929)
- (3) Bamann, E. u. M. Meisenheimer: In Bamann, E. u. K. Myrback:
Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig 1941, New York 1945, S. 1605
- (4) Bamann, E. u. W. -D. Mütterlein: Chem. Ber. 91, 471 (1958)
- (5) Bamann, E. u. W. -D. Mütterlein: Chem. Ber. 91, 1322 (1958)
- (6) Bamann, E. u. J. Riehl: Biochem. Z. 327, 136 (1955)
- (7) Bamann, E. u. J. Riehl: Chem. Ber. 88, 1556 (1955)
- (8) Bamann, E., J. Riehl u. R. Nicolai: Biochem. Z. 328, 12 (1956/57)
- (9) Bamann, E. u. J. Riehl: Naturwiss. 44, 538 (1957)
- (10) Bamann, E. u. W. Salzer: Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 1263 (1937)
- (11) Cavalier, J. : C. R. heb. Seances Acad. Sci. 122, 69 (1895)
- (12) Cavalier, J. : Bull. Soc. chim. France 13, 885 (1895), 15, 932 (1896)
- (13) Delory, G. E. a. E. J. King: Biochem. J. 37, 547 (1943)
- (14) Delory, G. E., G. S. Wiberg a. M. Hetherington: Canad. J. Biochem.
Physiol. 33, 539 (1955)
- (15) Falkenhausen, F., Freiherr v. : Biochem. Z. 253, 152 (1932)
- (16) Fiske, C. H. a. Y. Subbarow: J. biol. Chemistry 66, 375 (1925)
- (17) Hotta, R. : J. Biochemistry 20, 341 (1934)
- (18) Jacobsohn, K. P. : C. R. Seances Soc. Biol. Filiales Associees 105, 152 (1930)
- (19) Jacobsohn, K. P. u. J. Tapadinhas: Biochem. Z. 230, 304 (1931)
- (20) King, E. J. a. G. E. Delory: Biochem. J. 33, 1185 (1939)
- (21) Kohlrausch, F. : Praktische Physik, Bd. 2 20. Aufl., Stuttgart 1956, S. 259
- (22) Kosolapoff, G. M. : Organophosphorus Compounds, New York, John Wiley
a. Sons 1950, S. 211-278
- (23) Lineweaver, H. a. D. Burk: J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- (24) Lohmann, K. u. L. Jendrassik: Biochem. Z. 178, 419 (1926)
- (25) Lynen, F. : Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 367 (1940)
- (26) Manaka, C. : J. Biochemistry 14, 191 (1931)
- (27) Müller, E. : Neuere Anschauungen der Organischen Chemie, 2. Aufl.,
Berlin 1957, S. 266
- (28) Neuberg, C. u. K. P. Jacobsohn: Biochem. Z. 199, 498 (1928)
- (29) Nicolai, R. : Dissertation Universität München 1955
- (30) Riehl, J. : Hoppe-Seylers Zeitschrift f. physiol. Chemie, im Druck
- (31) Stuart, H. A. : Struktur des freien Moleküls, Heidelberg 1952, S. 228
- (32) Zervas, L. : Naturwiss. 27, 317 (1939)
- (33) Zetzsche, F. u. M. Nachmann: Helv. chim. Acta 8, 943 (1925)

Lebenslauf

Am 20. Februar 1929 bin ich als Sohn des Kaufmanns Adolf Stadelmann und seiner Ehefrau Laura, geb. Westermeyer in München geboren. Hier besuchte ich von 1935 bis 1939 die Volksschule, anschliessend das Alte Realgymnasium in München und legte dort im Juli 1948 die Reifeprüfung ab. Nach einem halben Jahr Bautätigkeit an der Universität München wurde ich im Sommersemester 1949 zum Studium in der Naturwissenschaftlichen Fakultät zugelassen. Ich studierte zunächst 6 Semester Chemie und wandte mich dann dem Studium der Lebensmittelchemie zu. Im Juli 1953 bestand ich das lebensmittelchemische Vorexamen, im Juni 1955 das Staatsexamen. Im Herbst 1955 begann ich dann mit der Ausführung der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter der Leitung seines Direktors, Herrn Prof. Dr. E. Bamann. In dieser Zeit habe ich auch die Dienste eines wissenschaftlichen Assistenten versehen.

